

ФАРМАКОГНОЗИЯ И БОТАНИКА

О.А. Ёршик, Г.Н. Бузук

УСКОРЕННОЕ СТАРЕНИЕ САБЕЛЬНИКА БОЛОТНОГО COMARUM PALUSTRE L.

Витебский государственный
медицинский университет

Проведено ускоренное старение листьев и корневищ с корнями сабельника болотного. Основные закономерности колебаний в содержании биологически активных веществ, возникающих в процессе ускоренного старения листьев и корневищ с корнями сабельника болотного, устанавливали с помощью следующих методов: ВЭЖХ, цветометрическое исследование, спектрофотометрия. Содержание фенольных соединений, в пересчете на галловую кислоту, определяли по методике с реагентом Фолина-Чокальте, содержание суммы проантоцианидинов — по модифицированной методике Porter с учетом подобранных оптимальных условий экстракции. Герметизация сырья в процессе хранения сабельника болотного способствует значительному снижению содержания основной группы биологически активных веществ, а именно суммы проантоцианидинов. В процессе ускоренного старения сабельника болотного происходит постепенная деполимеризация высокомолекулярных соединений с постепенным накоплением веществ, имеющих более низкие степени полимеризации, вплоть до мономеров.

ВВЕДЕНИЕ

Изучение стабильности лекарственного растительного сырья в процессе хранения является актуальной задачей фармации. Общей целью изучения стабильности является получение информации о возможных изменениях качества лекарственного растительного сырья с течением времени под влиянием факторов окружающей среды.

Ускоренные испытания проводят в особо неблагоприятных условиях хранения, вызывающих ускорение процессов химической деструкции или изменение физического состояния лекарственного растительного сырья.

В результате ускоренного старения лекарственного растительного сырья можно получить следующие данные: информацию об изменении качества лекарственного растительного сырья в процессе хранения, о влиянии на качество различных факторов окружающей среды (влажности, температуры), а также регламентировать условия хранения.

Результаты, полученные в ускоренных испытаниях, следует рассматривать как дополнительные данные к результатам долгосрочных испытаний стабильности [1].

Целью данной работы является установление основных закономерностей в содержании биологически активных веществ, возникающих в процессе ускоренного старения различных органов сабельника болотного.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объекта исследования использовали три серии образцов растений сабельника болотного (листья и корневища с корнями), заготовленные в сентябре 2006 г. в местах естественного произрастания в окрестностях г. Витебска Республики Беларусь. Собранные растения высушивали целиком в тени при комнатной температуре, затем разделяли на органы. До проведения анализов образцы хранились в бумажных пакетах при комнатной температуре.

Параллельно в термостат помещали 2 серии: 1-ая серия — измельченные листья и корневища с корнями сабельника болотного, находящиеся в термостате в открытом виде; 2-ая серия — в герметично упакованном виде. Экспериментальные образцы сабельника болотного выдерживали в термостате при температуре 60°C разное

по продолжительности время: 2, 6, 9, 16 дней.

Основные закономерности колебаний в содержании биологически активных веществ, возникающих в процессе ускоренного старения листьев и корневищ с корнями сабельника болотного, устанавливали с помощью ВЭЖХ, цветометрии и спектрофотометрии.

Количественное определение фенольных соединений, в пересчете на галловую кислоту, проводили по фотометрической методике, основанной на их окислении реагентом Фолина-Чокальте, содержащим фосфомолибдат и вольфрамат натрия [2].

Определение содержания суммы проантоцианидинов проводили по модифицированной методике Porter, в основе которой лежит кислотное расщепление проантоцианидинов до антоцианидинов в присутствии катализатора (ионов Fe^{3+}) с учетом подобранных оптимальных условий экстракции [3].

Хроматографическое исследование методом ВЭЖХ проводили на хроматографе Agilent HP 1100, неподвижная фаза - колонка Zorbax SB-C 18 (4,6×250 мм), 5 μm . Условия хроматографирования: температура колонки - 35°C, градиентный режим элюирования, скорость подачи элюента - 1 мл/мин. Для детектирования применяли УФ-детектор ($\lambda=280\text{ nm}$).

Из проб сырья листьев сабельника болотного, подвергнутых ускоренному старению, брали навески по 0,2500 г. Получали извлечения листьев сабельника болотного на 70% спирте этиловом в соотношении сырьё: экстрагент (1:25).

По 10 мкл полученных извлечений листьев сабельника болотного вводили в хроматограф и анализировали в описанных выше условиях.

Градиент элюирования представлен в табл. 1: раствор А, содержащий 50 ммоль/л фосфата натрия (рН 3,3) и 10% метанола; раствор В, содержащий 70% метанол [4].

Таблица 1 - Градиентный режим

Время, мин	Раствор А	Раствор В
0	100	0
15	70	30
45	65	35
65	60	40
70	50	50
90	0	100

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты определения общего содержания фенольных соединений и суммы проантоцианидинов представлены на рис. 1 и 2.

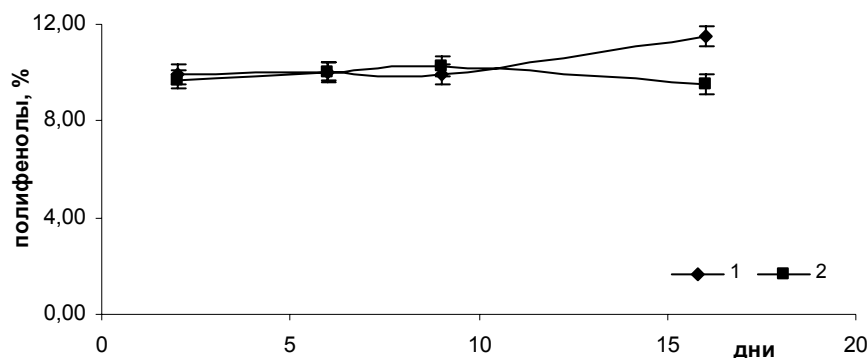


Рис. 1. Зависимость содержания фенольных соединений от срока ускоренного старения листьев сабельника болотного: 1 – открытая серия, 2 – закрытая серия

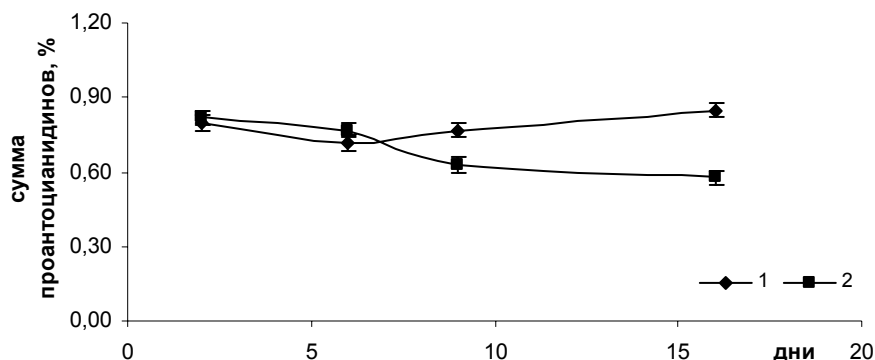


Рис. 2. Зависимость содержания суммы проантоцианидинов от срока ускоренного старения листьев сабельника болотного: 1 – открытая серия, 2 – закрытая серия

Герметизация листьев сабельника болотного в процессе ускоренного старения способствует незначительному снижению содержания суммы фенольных соединений и значительному снижению суммы проантоцианидинов. Различное влияние герметизации на степень уменьшения в содержании фенольных соединений и проантоцианидинов можно объяснить следующим образом: ускоренное старение листьев сабельника болотного направлено на постепенную деполимеризацию содержащихся высокомолекулярных проантоцианидинов с постепенным увеличением содержания проантоцианидинов с более низкой молекулярной массой, вплоть до мономеров. Модифицированная методика Porter является специфической для определения суммы проантоцианидинов [5], которые представлены соединениями с различным сочетанием и количеством входящих в их состав мономерных единиц флаван-3-ола: катехин, эпикатехин, галлокатехин и эпигаллокатехин и другие; в свою очередь, фотометрическая методика, основанная на окислении реагентом Фолина-Чокальте, является общей методикой для определения фенольных соединений, как высокомолекулярных, так и мономерных единиц. Поэтому увеличение содержания мономерных структур в процессе ускоренного старения нивелирует влияние герметизации на содержание фенольных соединений.

Согласно литературным данным [4], при хроматографическом исследовании

методом ВЭЖХ в использованном градиентном режиме катехины имеют следующий диапазон времен удерживания: 8,1 – 26,1 мин., что совпадает с полученными нами данными. Данный диапазон времен удерживания имеет узкий характер и не перекрывается другими группами биологически активных веществ. В состав группы «катехины» входят следующие вещества: (+) – катехин, (-) – галлокатехин, (-) – катехин галлат, (-) – галлокатехин галлат, (-) – эпикатехин, (-) – эпигаллокатехин, (-) – эпикатехин галлат, (-) – эпигаллокатехин галлат и другие.

Проведен хроматографический анализ методом ВЭЖХ спиртовых извлечений листьев сабельника болотного, подвергнутых ускоренному старению. На хроматограммах спиртовых извлечений проб листьев сабельника болотного (закрытая серия), срок старения которых составил 2, 6, 9 и 16 дней, были получены 3, 21, 14, 18 хроматографических пика (со временами удерживания, характерными для диапазона катехинов), общей площадью 214,8; 2363,9; 4506,6; 6913,8 mAU·s соответственно. Как видно, из полученных результатов, в процессе ускоренного старения увеличивается не только количество веществ из группы катехинов, но и их количественное содержание в листьях сабельника болотного.

Этот факт можно объяснить следующим образом: химический состав сабельника болотного представлен полифенольным комплексом, в котором преобла-

дают дубильные вещества, главным образом, конденсированные [6-8]. В настоящее время конденсированные дубильные вещества рассматриваются как высокополимерные производные проантоцианидинов [5]. Как правило, в растении одновременно находятся мономеры, димеры, тримеры, образующие далее тетрамеры, пентамеры, гексамеры, гептамеры, и высокомолекулярные цепи проантоцианидинов.

Проантоцианидиновые комплексы представлены соединениями с различным сочетанием и количеством входящих в их состав мономерных единиц флаван-3-ола: катехин, эпикатехин, галлокатехин и эпигаллокатехин и других. Поэтому в процессе ускоренного старения листьев сабельника болотного происходит постепенная деполимеризация высокомолекулярных

соединений с постепенным накоплением веществ, имеющих более низкие степени полимеризации, вплоть до мономеров.

На хроматограммах спиртовых извлечений проб листьев сабельника болотного (открытая серия), срок старения которых составил 2 (рис. 3), 6, 9 и 16 (рис. 4) дней, были получены 7, 23, 20, 19 хроматографических пика (со временами удерживания, характерными для диапазона катехинов), общей площадью 4196,1; 2885,3; 2671,2; 3017,7 mAU·s соответственно. Как видно, из полученных результатов, в процессе ускоренного старения увеличивается количество веществ из группы катехинов, количественное содержание катехинов в листьях сабельника болотного колеблется незначительно.

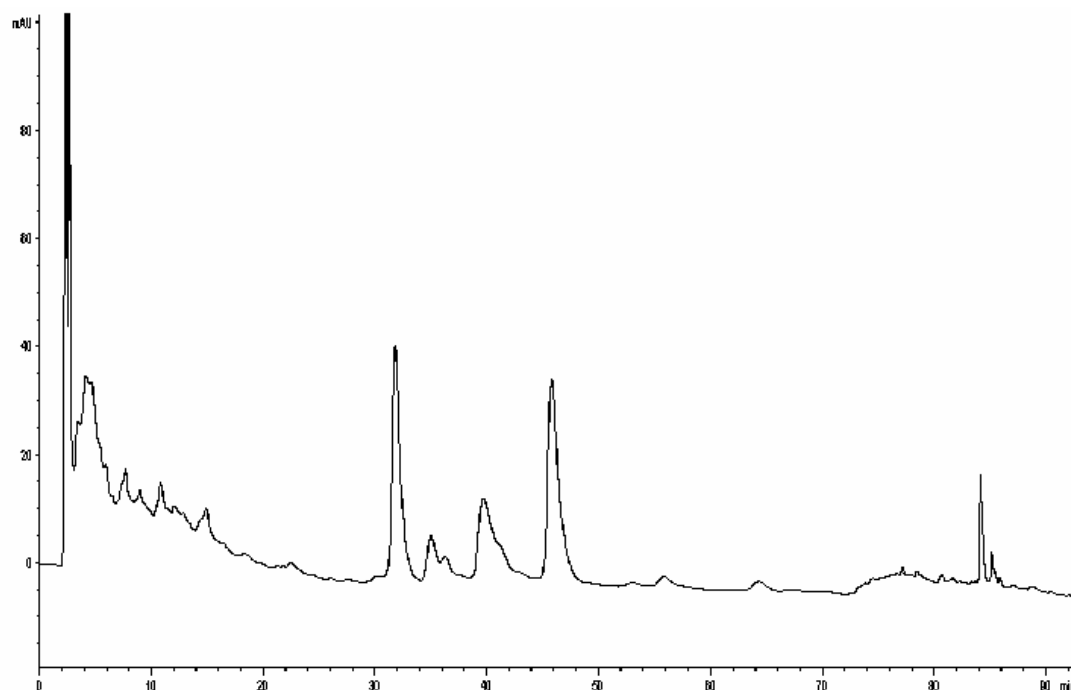


Рис. 3. Хроматограмма извлечения листьев сабельника болотного, срок старения которых 2 дня (открытая серия)

При сравнении результатов хроматографического анализа проб листьев сабельника болотного, подвергнутых ускоренному старению в открытом и закрытом виде, можно сделать вывод, что герметизация способствует более глубокому старению листьев сабельника болотного.

Цветометрическое исследование. В процессе ускоренного старения проб ли-

стьев сабельника болотного происходило изменение цвета лекарственного растительного сырья. Поэтому нами было проведено цветометрическое исследование проб листьев сабельника болотного, подвергнутых ускоренному старению.

Для определения цветовых характеристик лекарственного растительного сырья после ускоренного старения помещали

в пластиковые чашки Петри и сканировали на сканере Mustek 1200 USB. Полученные изображения обрабатывали с помощью

программы DStretch ver. 6.2 by Jon Harman (dstretch@prodigy.net) www.DStretch.com.

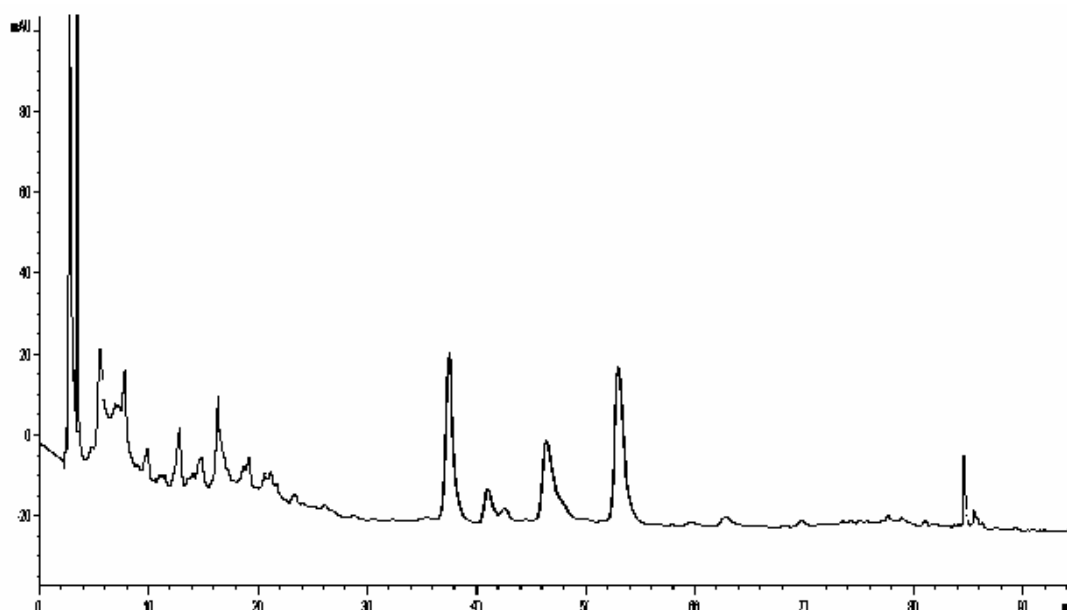


Рис. 4. Хроматограмма извлечения листьев сабельника болотного, срок старения которых 16 дней (открытая серия)

Результаты проведенного цветометрического исследования представлены на рис. 5 и 6.

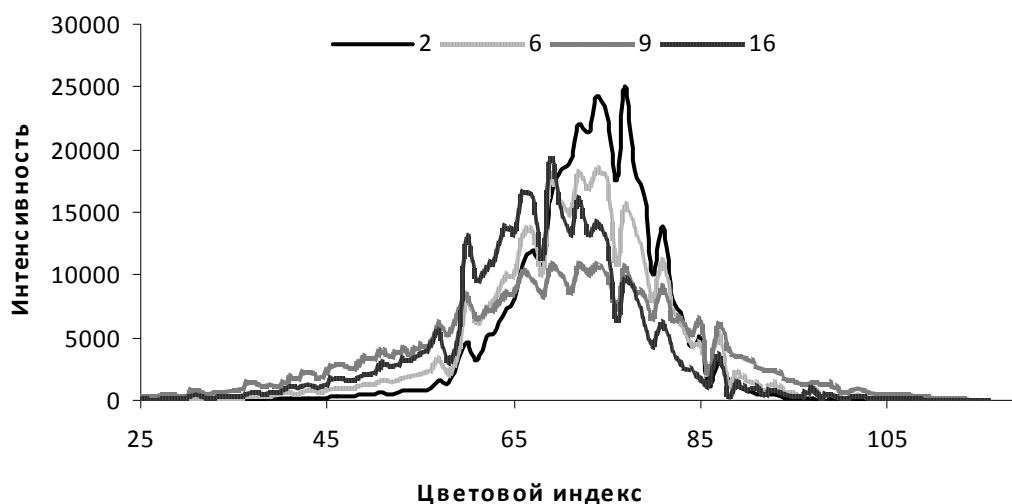


Рис. 5. Цветограмма листьев сабельника болотного, подвергнутых ускоренному старению в открытой форме

Изменение цвета проб, подвергнутых ускоренному старению в открытой форме в течение 2, 6 и 9 дней, носит следующий характер (рис. 5): спектр этих проб одинаков, а изменения обусловлены

интенсивностью цвета, которая постепенно уменьшается. И лишь, для пробы листьев со сроком ускоренного старения 16 дней характерно увеличение интенсивности цвета со сдвигом спектра.

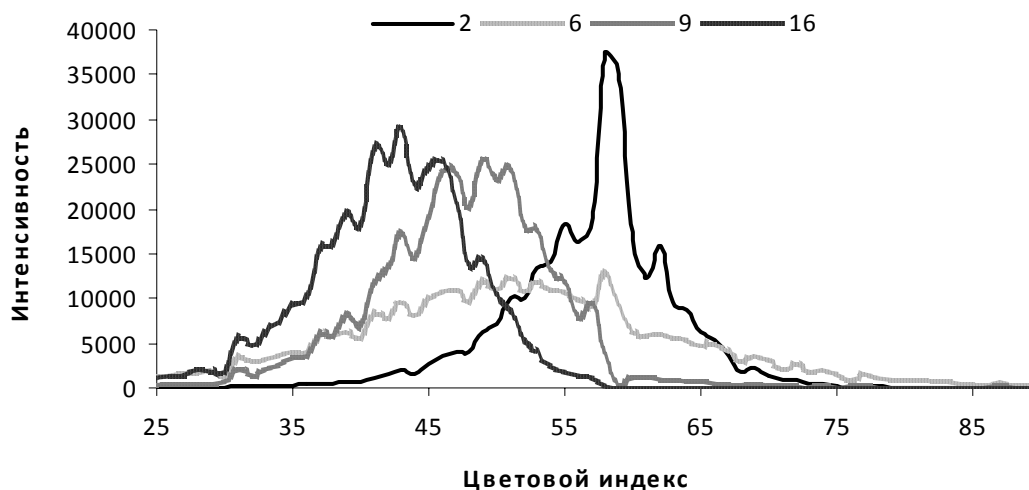


Рис. 6. Цветограмма листьев сабельника болотного, подвергнутых ускоренному старению в закрытой форме

В случае проб, подвергнутых ускоренному старению в закрытой форме в течение 2, 6 и 9 дней, было установлено (рис. 6) уменьшение интенсивности цвета со значительным сдвигом спектра. Для пробы листьев со сроком ускоренного старения 16 дней характерно увеличение интенсив-

ности цвета со значительным сдвигом спектра.

Зависимости колебаний в содержании суммы проантоцианидинов и полифенольных соединений в процессе ускоренного старения корневищ с корнями сабельника болотного носят несколько иной характер (рис 7 и 8).

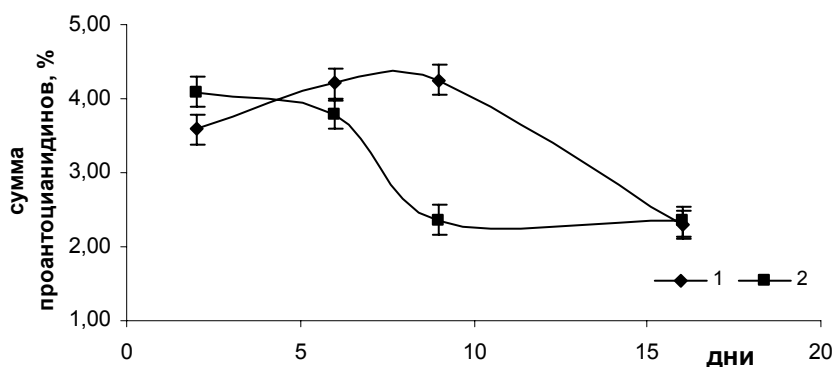


Рис. 7. Зависимость содержания суммы проантоцианидинов от срока ускоренного старения корневищ с корнями сабельника болотного: 1 – открытая серия, 2 – закрытая серия

Сделанные нами выводы в процессе ускоренного старения листьев сабельника болотного имеют соответствующее подтверждение: герметизация корневищ с корнями сабельника болотного в процессе ускоренного старения способствует значительному снижению содержания суммы проантоцианидинов.

Измельченные корневища с корнями сабельника болотного представляют собой порошок от светло-желтого до слабо серого цвета. В процессе ускоренного старения проб корневищ с корнями сабельника болотного цвет лекарственного растительного сырья изменялся незначительно, поэтому динамику изменения цвета проследить не представляется возможным.

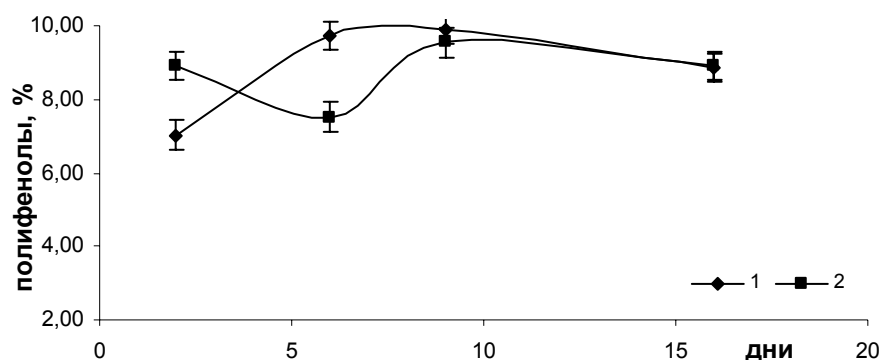


Рис. 8. Зависимость содержания фенольных соединений от срока ускоренного старения корневищ с корнями сабельника болотного: 1 – открытая серия, 2 – закрытая серия

ВЫВОДЫ

Герметизация сырья в процессе хранения сабельника болотного способствует значительному снижению содержания основной группы биологически активных веществ, а именно суммы проантоцианидинов.

В процессе ускоренного старения сабельника болотного происходит постепенная деполимеризация высокомолекулярных проантоцианидинов с постепенным накоплением проантоцианидинов, имеющих более низкие степени полимеризации, вплоть до мономеров.

SUMMARY

O.A. Yorshyk, G.N. Buzuk
ACCELERATED AGEING OF
COMARUM PALUSTRE L.

An accelerated ageing of leaves and rhizomes with roots of *Comarum palustre* has been conducted. The main conformities of fluctuations in the contents of biologically active substances, appearing in the process of accelerated ageing of leaves and rhizomes with roots of *Comarum palustre*, were established using the following methods: HPLC (High Performance Liquid Chromatography), colorimetric research, spectrophotometric method. The contents of phenol compositions calculated via gall acid were conducted using methods of Folin-Chocalte with reagent, the contents of the sum of proantocyanidins was calculated according to the modified methods Porter, considering preselected optimal condi-

tions of extraction. Hermetization of raw material in the process of storage of *Comarum palustre* contributes to a considerable decrease of contents of the main group of biologically active substances, in particular the sum of proantocyanidins. In the process accelerated ageing of *Comarum palustre* occurs a gradual depolymerization of highly molecular combinations with gradual accumulation of substances, which have lower degrees of polymerization, up to monomers.

ЛИТЕРАТУРА

1. Методические указания по изучению стабильности и установлению сроков годности новых субстанций и готовых лекарственных средств: утв. Бел. гос. концерн по производству и реализации фарм. и микробиол. продукции «Белбиофарм» МУ 09140.07-2004. – Минск: 2004. – 57 с.
2. Гнедков, П.А. О качестве сырья для получения препарата Биосед / П.А. Гнедков, А.П. Гнедкова // Химико-фармацевтический журнал. – 1975. – Т 9. – С. 36-41.
3. Ёршик, О.А. Количественное определение проантоцианидинов в сабельнике болотном *Comarum palustre* L. / О.А. Ёршик, Г.Н. Бузук // Вестник Фармации. – 2007. – № 4. – С. 10-17.
4. Simultaneous Determination of All Polyphenols in Vegetables, Fruits, and Teas / Hiroyuki Sakakibara [et al.] // J. Agric. Food Chem. – 2003. – Vol. 51. – P. 571–581.

5. Miami University's centralized web server for personal web pages [Electronic resource] / Professor Ann E. Hagerman. – Tannin Chemistry. – Oxford, 2002. – mode of access:

<http://www.users.muohio.edu/hagermae/tannin.pdf>. – Date of access: 1.10.2006.

6. Лантраторва, А.С. Сезонное развитие сабельника болотного и багульника болотного в южной Карелии и динамика содержания минеральных и органических веществ в их растительном сырье / А.С. Лантраторва [и др.] // Сезонная ритмика и продуктивность дикорастущих лекарственных растений. – М., 1988. – С.62-73.

7. Люкшенкова, Е.Я. Фармакологическое изучение сабельника болотного (*Comarum palustre* L.) / Е.Я. Люкшенкова, М. Георгиу, Э.А. Бур-дыкина-Шехтер // Аптечное дело. – 1962. – № 2. – С. 34-44.

8. Наумчик, Г.Н. Фитохимическое исследование сабельника болотного и приготовление из него некоторых лекарственных препаратов: автореф. дис. ... канд. фарм. наук / Ленинградский хим. фарм. институт. – Л., 1964. – 17 с.

Поступила 13.05.2008 г.

Н.С. Фурса¹, М.Е. Жаворонкова¹,
Л.С. Мазепина¹, В.Л. Шелюто

МАСС - СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ МАКРО-, МИКРО-И УЛЬТРАМИКРОЭЛЕМЕНТОВ В ЛИСТЬЯХ 3 ВИДОВ ВЕРЕСКОВЫХ И 2 ВИДОВ ГРУШАНКОВЫХ

¹ Ярославская государственная
медицинская академия
Витебский государственный
медицинский университет

Изложены результаты масс-спектрометрического определения элементного состава в листьях рододендрона Адамса, р. золотистого, толокнян-

ки обыкновенной, зимолюбки зонтичной и грушанки круглолистной.

Одним из классических диуретиков и уросептиков, показанном при болезнях почек и мочевыводящих путей (циститах, цистолитиазах, нефритах, мочекаменной болезни, дизурии), являются листья толокнянки (*Arctostaphylos uva-ursi* (L.) Spreng.). семейства вересковых (*Ericaceae* Juss.).

По этим же показаниям используют листья грушанки круглолистной (*Pyrola rotundifolia* L.) и зимолюбки зонтичной (*Chimaphila umbellata* (L.) W. Barton.) семейства грушанковых (*Pyrolaceae* Dumort) [1-3]. Диуретическими свойствами обладают также листья рододендрона золотистого (*Rhododendron aureum* Georgi) и р. Адамса (*R. adamsii* Rehder) [1, 2].

Химический состав исследуемых растений весьма разнообразен [1-6]. Вместе с тем не предпринималось сравнительное изучение их элементного состава.

Биологическая активность растений реализуется через сбалансированный химический состав. При этом определенное значение имеют отдельные химические элементы, среди которых 15 (Fe, I, Cu, Zn, Co, Cr, Mo, Ni, V, Se, Mn, As, Si, Li, F) - эссенциальные, 2 (B, Br) - условно эссенциальные и 4 (Cd, Pb, Al, Rb) претендуют на эссенциальность [7].

Цель исследования - определение макро-, микро- и ультрамикроэлементов в упомянутых выше растениях.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектом исследований служили листья рододендрона золотистого и р. Адамса, заготовленные в Иркутской области; листья толокнянки, собранные в Ярославской области; листья грушанки круглолистной и зимолюбки зонтичной, заготовленные в окрестностях с. Сосновки Белгородского района Белгородской области. Анализ элементного состава провели с использованием метода масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой на приборе ELAN-DRC-e. При этом точность определений контролировали методом добавок.